基于体外细胞模型的霉菌毒素毒性评价

邱思奇[1,2]　徐贞贞[1*]　沈　红[2]　杨曙明[1]　陈爱亮[1]　赵　燕[1]

(1.中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所，农业部农产品质量安全重点实验室，北京 100081；2.北京农学院动物科学技术学院，北京 102206)

摘　要：霉菌毒素是由多种真菌产生的次级代谢产物，广泛存在于食品和饲料中。霉菌毒素污染的粮食和饲料会给畜牧业生产和畜产品质量安全带来极大隐患。研究霉菌毒素致毒机理，为今后研究其对动物及人的影响开展更深入更全面的研究提供理论依据。细胞模型作为一种常用的体外试验方法广泛用于毒理学研究中。本文简述了黄曲霉毒素 B_1（AFB_1）、赭曲霉毒素 A（OTA）、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）、玉米赤霉烯酮（ZEA）和展青霉素（PAT）的一般特性，并综述了利用细胞模型进行 AFB_1、OTA、DON、ZEA 和 PAT 毒性、联合毒性及致毒机理研究的进展。

关键词：霉菌毒素；毒性；细胞模型

中图分类号：S852.2　　　文献标识码：A　　　文章编号：

霉菌毒素（mycotoxins）是由镰刀菌属（*Fusarium*）、曲霉菌属（*Aspergillus*）和青霉菌属（*Penicillium*）等真菌在生长过程中产生的次生有毒代谢产物[1-2]。已报道的 300 多种霉菌毒素中，以黄曲霉毒素（alatoxin，AF）、单端孢霉烯毒[tichothecenes，如脱氧雪腐镰刀菌烯醇（deoxynivalenol，DON）和 T-2 毒素]、赭曲霉毒素（ochratoxin A，OTA）、玉米赤霉烯酮（zearalenone，ZEA）、伏马毒素（fumonisins B_1,FB_1）等对畜牧业危害最大[1]。霉菌毒素

收稿日期：2017–02–01

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（31401666）；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（1610072016014）

作者简介：邱思奇（1991—），女，湖北应城人，硕士研究生，基础兽医学专业。E-mail: 623606844@qq.com

*通信作者：徐贞贞，助理研究员，E-mail: xuzhenzhen@caas.cn

广泛存在于食品和饲料中，是全球畜牧业生产、畜产品质量安全及食品安全所面临的一个重要问题[3]。

我国现行饲料卫生国家标准 GB 13078.1—2001、GB 13078.2—2006、GB 13078.3—2007 及 GB 21693—2008 中对饲料中的黄曲霉毒 B_1（aflatoxin B_1，AFB_1）、OTA、ZEA、DON 及 T-2 毒素 5 种毒素的限量指标进行了规定；食品安全国家标准 GB 2761—2011 规定了食品中 AFB_1、黄曲霉毒 M_1（aflatoxin M_1，AFM_1）、DON、展青霉素（patulin，PAT）、OTA 及 ZEA 6 种的限量指标。2016 年 8—12 月，我国颁布了食品安全国家标准 GB 5009.240—2016 等 9 项、10 余种霉菌毒素的检测标准（国家卫生计生委食品药品监管总局“2016 年第 11 号”和“2016 年第 17 号”公告），其中杂色曲霉素（sterigmatocystin，ST）、桔青霉素（citrinin，CIT）等尚无对应限量标准。

制定饲料、食品中真菌毒素限量标准和法规时，需要进行科学及贸易等方面综合的风险评估。影响风险评估结果的科学因素包括：各商品中出现霉菌毒素的可能性和毒理学数据等[4]。对各类霉菌毒素的致毒机理研究是进行食品安全风险评估的重要基础。毒理学研究方法主要有体内试验、体外试验、人体观察及流行病学研究等方法。其中细胞模型作为一种重要的体外试验方法，已被应用于霉菌毒素毒理学研究领域中。本文简述了 AFB_1、OTA、DON、ZEA 和 PAT 的一般特性，并综述了利用细胞模型进行 AFB_1、OTA、DON、ZEA 和 PAT 毒性、联合毒性及致毒机理研究的进展。

1 AF

1.1 一般特性

AF 是通过聚酮途径由黄曲霉（*Aspergillus flavus*）和寄生曲霉（*Aspergillus parasiticus*）所产生的一种对人类和畜禽危害最大、最常见的霉菌毒素[2]。从 1961 年开始人们先后在粮食中发现了 AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2，后来又从牛奶中分离出 AFM_1 和 AFM_2。其中，AFB_1 是目前研究最多且已知致癌毒性最强的霉菌毒素。黄曲霉毒素通常由含有 1 个双氢呋喃环和 1 个氧杂萘邻酮的基本结构单位构成。AF 难溶于水、已烷、石油醚，可溶于甲醇、乙醇、氯仿、丙酮；具有热稳定，在焙烧、挤压、烘烤、蒸煮等过程也不会被破坏。

1.2 毒性及致毒机制

AF 主要引起肝脏损伤，有强烈的肝毒性，也会对呼吸系统、肾脏、心脏和皮肤造成严

重的损害[5-6]，在动物上的研究都表明其具有强烈的致癌性。其中 AFB_1 是研究时间最长、毒性研究相对最为明确的一种毒素，是已知对人类和动物食品污染最严重且致癌性最强的霉菌毒素，2002 年被国际癌症研究机构（international agency for research on cancer，IARC）列为 1 类致癌物。近年来，针对 AFB_1 研究以各类快速检测方法及降毒机制为主，基于细胞模型的研究多针对其致癌分子机制。

AFB_1 的致癌机制报道有：Yang 等[7]研究表明，10 mg/mL AFB_1 会抑制人肝癌细胞 HepG2 的细胞活力，诱导 HepG2 细胞凋亡。Parveen 等[8]研究表明，0.25 μg/mL AFB_1 还能通过诱导氧化应激对犬肾细胞（MDCK）造成损伤。AFB_1 能与肝细胞内 DNA、RNA 或蛋白质结合，抑制大分子的合成，导致细胞癌变或凋亡[9-10]；AFB_1 通过激活转录因子 E2F1 来上调肿瘤基因 *H*19 的表达，从而促进肝癌细胞的生长[11]。AFB_1 可在肝脏中经由细胞色素 P450 酶转化成反应中间体 AFB_1-8,9-环氧化合物，该中间体与 DNA 形成加合物 AFB_1-$_7$N-鸟嘌呤（AFB_1-$_7$N-GUN），对 DNA 造成损伤，进而导致突变[12-13]。其中，AFB_1 及其代谢产物外 8,9-环氧 AFB_1（exo-AFBO）能增强抑癌基因 *p*53 突变的敏感性，引起 *p*53 基因突变率升高，突变型 *p*53 基因具有癌基因的性质，它会抑制细胞凋亡，引起细胞恶性转化，导致细胞异常扩增，最后形成肿瘤[2,14]。这些报道主要集中在 AFB_1 及其代谢物 exo-AFBO 的表观遗传基因调控，比如调控 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质凝聚、微小 RNA 的表达等方面，从而改变基因表达[15]。此外，黄曲霉毒素也能诱导表观遗传蛋白的改变，100 和 1 000 nmol/L 的 AFB_1 能显著增加人肺上皮细胞 L-132、永生化角质形成细胞 HaCaT、HepG2 以及胚肾细胞 HEK 293 中的蛋白精氨酸甲基转移酶 5（*RPMT*5）的表达[16]。

2　OTA

2.1　一般特性

OTA 是由青霉菌属和曲霉菌属真菌产生[17]，是毒性最大、分布最广、对人类危害严重的一种霉菌毒素。OTA 是苯丙氨酸与异香豆素结合体衍生物，是一种无色结晶化合物，溶于极性溶剂和碳酸氢钠溶液，微溶于水，在紫外线照射下呈绿色荧光。OTA 溶点为 134 ℃，性质稳定，其甲醇溶液在冰箱中保存 1 年而不会分解[18]。

2.2　毒性及致毒机制

OTA 最典型的毒性是肾毒性[19]，同时具有肝毒性、神经毒性、免疫毒性[20-21]，并有致

畸、致突变和致癌等作用[22-23]。1993 年，OTA 被 IARC 列为是 2B 类致癌物。基于人淋巴细胞、绿猴肾细胞（Vero-E6）、人宫颈癌细胞（HeLa）、人肾细胞（IHKE、IHKE、HEK-T-293、HK2）及人胃黏膜上皮细胞（GES-1）细胞模型的 OTA 的毒性见表 1，其致毒机制主要表现在以下几个方面：诱导氧化应激、破坏细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制蛋白质合成等[24-25]。

表 1　赭曲霉毒素毒性及机制

Table 1　Ochratoxin toxicity and mechanism

细胞类型 Cell types	霉菌毒素浓度 Mycotoxin concentration/(μmol/L)	毒性 Toxicity	毒性机制 Toxicity mechanism	参考文献 Reference
人淋巴细胞 Human lymphocyte	<5 >15	基因毒性 细胞毒性	诱导人淋巴细胞微核形成和延缓 DNA 修复	[21]
绿猴肾细胞 Green monkey kidney cells（Vero-E6）		肾毒性	诱导活性氧产生，造成 DNA 氧化损伤	[26]
人宫颈癌细胞 Human cervical cancer cell（HeLa）	15	诱导细胞凋亡	通过对 Bcl-2 家族成员调制，来参与诱导线粒体凋亡通路	[27]
人肾细胞 Human kidney cells（IHKE、IHKE、HEK-T-293、HK2）		细胞毒性、诱导细胞凋亡、坏死		[28]
人胃黏膜上皮	20	细胞周期阻	抑制了细胞周期蛋白	[29]

细胞 滞 激酶表达量

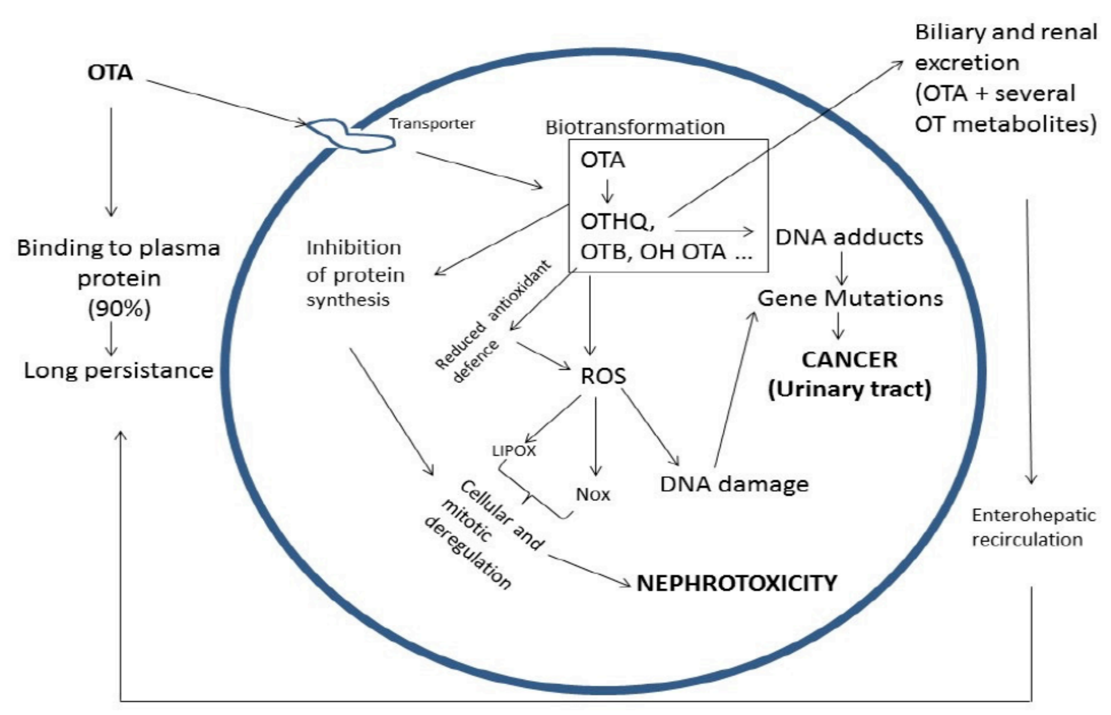
Human gastric

mucosal

epithelial cells

（GES-1）

大量 OTA 毒性研究表明，OTA 产生肾毒性、肝毒性和免疫毒性，是因为它与抑制蛋白质的合成，造成脂质过氧化和调节丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路有关联，OTA 在细胞内经代谢活化，产生代谢物能与 DNA 结合形成加合物，改变遗传物质结构，产生致癌性（图 1）[19]。Darif 等[30]研究表明，OTA 可通过调节存活蛋白、白细胞介素（*IL*）-2 和肿瘤坏死因子-α（*TNF-α*）mRNA 的表达扰乱线粒体功能，激活 MAPK 信号通路，从而表现出免疫毒性。尽管部分研究表明 OTA 通过与 DNA 结合形成加合物，延缓 DNA 修复，造成细胞凋亡，但是仍有少量研究未能确定 DNA 加合物的形成[21]。另有研究表明，OTA 的致毒活性与其分子结构有一定的关系，Rottkord 等[28]对 OTA 结构中卤原子和氨基酸基团在其致毒活性作用中的研究表明，OTA 的氨基酸部分在其与目标分子的相互作用中起不可或缺的作用。



OTA：赭曲霉毒素 A ochratoxin A；OTHQ：羟基醌赭曲霉毒素 hydroxyquinone ochratoxin；OTB：脱氯赭曲霉毒素 dechloro ochratoxin；OH OTA：羟基赭曲霉毒素 A hydroxy

ochratoxin A；LIPOX：脂质过氧化 lipid peroxidation；Nox：氮氧化物 nitrogen oxides；ROS 活性氧 reactive oxygen species；DNA damage：DNA 损伤；DNA adducts：DNA 加合物；Gene mutations：基因突变；Cancer （urinary tract）：癌症（泌尿道）；Nephrotoxicity：肾毒性；Binding to plasm protein （90%）：与血浆蛋白结合（90%）；Long persistence：长时间持续；Transporter：转运体；Biotransformation：生物转化；Inhibition of protein synthesis：抑制蛋白合成；Cellular and mitotic deregulation：细胞和有丝分裂异常；Reduced antioxidant defence：降低抗氧化防御；Biliary and renal excretion(OTA+several OT metabolites)：胆汁和肾脏排泄（OTA+几个赭曲霉毒素代谢产物）；Enterohepatic recirculation：肠肝循环。

图 1 OTA 的生化效应总结

Fig.1 Summary of biochemical effects of OTA[19]

3 DON

3.1 一般特性

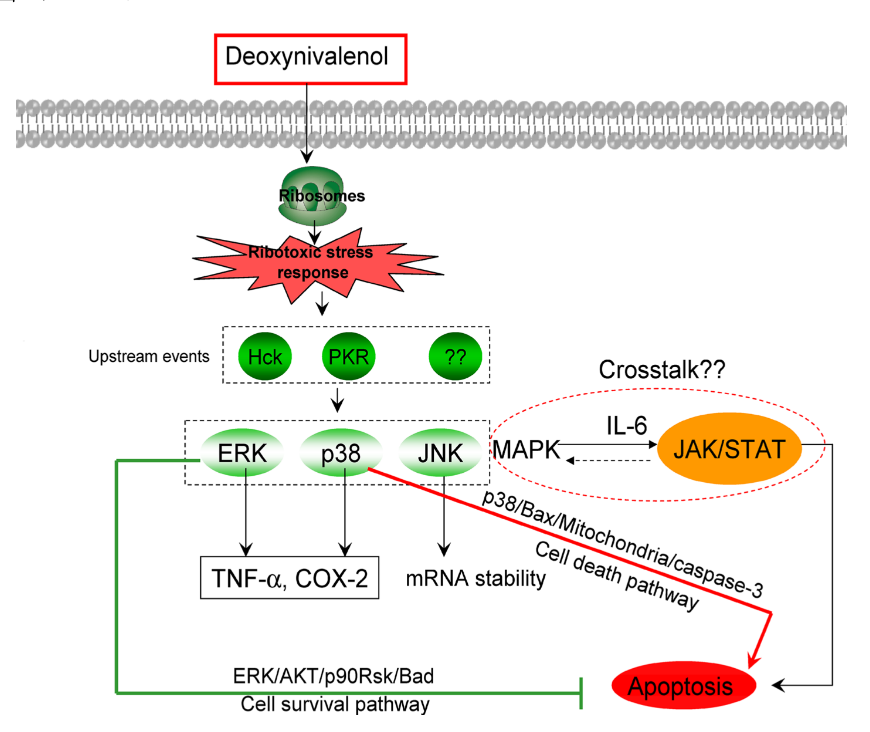
DON 又称呕吐毒素，是一种单端孢霉烯族毒素，主要由镰刀菌产生，它是谷物中最常见的一种霉菌毒素[31]。DON 的结构是四环的倍半萜，固体是一种无色针状结晶，易溶于水、甲醇、含水乙醇和乙酸乙酯等极性溶剂，不溶于正己烷、乙醚等非极性溶剂。DON 熔点为 151~153 ℃，具有较强的热抵抗力和耐酸性，pH 为 4.0 时，DON 在 100 和 120 ℃加热 60 min 均不被破坏，170 ℃加热 60 min 也仅少量被破坏[32]。

3.2 毒性及致毒机制

DON 主要影响胃肠道和免疫系统，在动物和人类身上引起各种疾病，如呕吐和胃肠炎。目前 DON 的致癌作用尚不清楚，IARC 将其列为 3 类致癌物。淋巴细胞对 DON 的毒性较为敏感，Strasser 等[33]研究发现，DON 能通过增加细胞中脂质过氧化和蛋白质氧化而损伤细胞，抑制小鼠淋巴瘤细胞（YAC-1）的增殖。与淋巴细胞相比，肝细胞对 DON 敏感性较弱，但 DON 同样能其对造成氧化损伤[34]。DON 对动物和人肠上皮细胞（IECs）的活力影响较大，低剂量[半抑制浓度(IC_{50})=0.3~1.5 mg/mL]时能抑制细胞增殖，高剂量（IC_{50}=3~15 mg/mL）时对人类、猪和大鼠肠上皮细胞有细胞毒性作用，甚至会诱导细胞凋亡[35-38]。

从分子水平来看，DON 可以和核糖体结合，抑制 DNA、RNA、蛋白质的合成，诱导真核细胞凋亡[39]。Broekaert 等[40]对 DON 的 2 种衍生物 3-乙酰基脱氧 DON（3-acetyl-DON，

3-Ac-DON）、15-乙酰基脱氧 DON（15-acetyl-DON，15-Ac-DON）和一种代谢物 DON-3-葡萄糖苷（DON-3-glucoside，D3G）与 DON 的细胞毒性进行了比较，采用流式细胞术分析其诱导 IECs 细胞凋亡情况，发现细胞毒性排序为：D3G<<3-Ac-DON<DON≈15-Ac-DON。Li 等[41]研究表明，DON 能将小鼠胸腺上皮细胞（MTEC1）细胞周期阻滞在 G1 期而抑制其增殖，并诱导细胞凋亡。研究表明 DON 诱导细胞凋亡与信号转导通路有关，主要涉及到 MAPK 和 Janus 蛋白酪氨酸激酶(Janus protein tyrosine kinase,JAK)/信号转导和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription,STAT)这 2 条信号通路。DON 进入细胞，与核糖体结合，产生应激反应，将信号传导给蛋白激酶 R(protein kinase R，PKR)和造血细胞激酶(hematopoietic cell kinase，Hck)，再激活细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)、p38 和应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)这 3 条信号转导通路，ERK 和 p38 的激活进一步导致 DON 诱导的 TNF-α 和巨噬细胞中环氧化酶(Cyclooxygenase，*COX*)-2 上调，JNK 则增加 mRNA 稳定性（图 2）[32,39]。



DON：脱氧雪腐镰刀菌烯醇 deoxynivalenol；Hck：造血细胞激酶 hematopoietic cell kinase；PKR：蛋白激酶 protein kinase R；ERK：细胞外调节蛋白激酶 extracellular regulated protein kinases；p38：p38 蛋白激酶 p38 protein kinase；JNK：c-Jun 氨基末端激酶 c-Jun N-terminal kinase；MAPK：丝裂原活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinase；IL-6：白细胞介素-6 interleukin-6；JAK/STAT：Janus 蛋白酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子 Janus

protein tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription；TNF-α：肿瘤坏死因子-αTumor necrosis factor-α；COX-2：环氧合酶-2 cyclooxygenase-2；mRNA stability：信使 RNA 稳定性；Bax：凋亡促进因子 apoptosis promoting factor；Mitochondrial：线粒体；caspase-3：胱天蛋白酶-3；Cell death pathway：细胞死亡通路；AKT：丝氨酸/苏氨酸激酶 Serine / threonine kinase；p90Rsk：p90 核糖体 S6 激酶 p90 ribosomal S6 kinase；Cell survival pathway：细胞存活通路；Apoptosis：凋亡。

图 2　DON 在细胞凋亡进程中介导的信号通路

Fig.2　DON-mediated signal transduction in the apoptotic process[39]

4　ZEA

4.1　一般特性

ZEA 又称 F-2 毒素，是由镰刀菌属真菌尤其是禾谷镰刀菌（*Fusarium graminearum*）产生的一类具有雌激素样作用的霉菌毒素，它广泛存在于霉变的玉米、高粱、小麦等谷类作物和奶中。ZEA 属于二羟基苯甲酸内酯类化合物，为白色结晶，显微镜下为簇针状，其熔点为 161~163 ℃。ZEA 不溶于水，溶于碱性溶液、乙醚、苯、甲醇以及乙醇等。在 245 nm 紫外光下呈亮蓝色，经三氯化铁（$FeCl_3$）水溶液喷射后呈现紫红色斑点[42]。

4.2　毒性及致毒机制

ZEA 具有生殖毒性，它与内源性雌激素在结构上相似，能像雌激素一样，通过与雌激素受体（ER）竞争性的结合，激活雌激素反应元件，使受体发生二聚化，从而发生一系列拟雌激素效应[43]。Li 等[44]研究表明，ZEA 浓度超过 5 μmol/L 时，小鼠睾丸间质瘤细胞（MLTC-1）的活力显著降低。高剂量 ZEA 能抑制猪卵泡颗粒细胞增殖，诱导细胞凋亡和坏死[45]。ZEA 主要在肝脏中代谢，它对肝脏也能造成一定的毒性。Gazzah 等[46]和 Kang 等[47]研究表明，ZEA 能抑制肝细胞（HepG2、张氏肝细胞）活力。然而，ZEA 对肠细胞的影响有所不同，有研究发现，尽管高剂量 ZEA 能抑制人结肠癌细胞（HCT116）活力，但低剂量时能显著促进 HCT116 增殖、克隆形成和迁移。

ZEA 致毒机制根据细胞类型和暴露途径不同有所不同，大多研究表明，ZEA 能损伤 DNA、诱导氧化应激和促进细胞凋亡等。ZEA 对神经细胞 SHSY-5Y、仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 和张氏肝细胞的毒性为增加细胞内活性氧（ROS）水平和造成 DNA 损伤[48-49]。Kang 等[47]采用彗星试验（SCGE）检测 ZEA 对张氏肝细胞的毒性，结果表明，较低浓度 ZEA（25 μmol/L）

可使 DNA 损伤，浓度越高，损伤越严重，同时，ZEA 还会对张氏肝细胞造成氧化损伤。ZEA 也能诱导肝细胞凋亡。Gazzah 等[46]研究发现，ZEA 能促进 HepG2 细胞凋亡。此外 ZEA 还能诱导山羊睾丸间质细胞 GLC 和大鼠睾丸支持细胞凋亡[50-51]。ZEA 诱导细胞凋亡和造成细胞氧化损伤过程中参与了信号转导通路的激活。Zhu 等[45]研究了 ZEA 对猪卵泡颗粒细胞的促凋亡作用，发现用 ZEA 处理的细胞中活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase，caspase)-3 和 caspase-9 的表达显著高于对照组，表明 ZEA 通过激活 caspase-3 和 caspase-9 依赖的线粒体信号通路而诱导细胞凋亡。Yu 等[52]研究结果表明，ZEA 通过参与 MAPK-依赖信号通路的调节实现对 RAW264.7 巨噬细胞造成氧化损伤，导致细胞死亡。ZEA 诱导心肌细胞自噬途径的激活。Ben 等[53]研究中将 ZEA 和其衍生物（α-ZOL、β-ZOL）作用于心肌细胞 H9c2，发现 LC3-Ⅱ水平增加，表明 ZEA 促进了心肌细胞的自噬作用。ZEA 的致癌作用仍不明确，IARC 将其列为 3 类致癌物。

5 PAT

5.1 一般特性

PAT 又称棒曲霉素，由青霉菌属和曲霉菌属真菌产生生。PAT 主要存在于苹果、山楂、梨和番茄等水果及其制品中。PAT 为无色棱形晶体，熔点为 110.5~112.0 ℃，易溶于水、氯仿、丙酮、乙醇及乙酸乙酯，微溶于乙醚和苯，不溶于石油醚。在于氯仿、苯、二氯甲烷等溶剂和酸性溶液中很稳定，在水和甲醇中逐渐分解，且在碱性溶液中不稳定，易被破坏[54]。

5.2 毒性及致毒机制

PAT 主要影响胃肠道功能、免疫应答以及肾功能等。食物进入胃肠道，使胃肠道直接暴露于腐败食物中高浓度的 PAT，影响胃肠功能。有研究表明，PAT 能增加肠上皮细胞 Caco-2 的通透性[55]。Donmez-Altuntas[56]等研究结果表明，PAT 浓度为 0.1~7.5 μmol/L 能诱导人淋巴细胞凋亡，浓度为 0.3~7.5 μmol/L 能诱导人淋巴细胞坏死。PAT 能抑制几种巨噬细胞的功能[57]，它能抑制人巨噬细胞分泌干扰素-γ(IFN-γ)和 IL-4[58]，以及抑制人外周血单核细胞和人 T 淋巴细胞分泌 IL-4、IL-13、IFN-γ 和 IL-10[59]，同样，Marin 等[60]研究表明，PAT 能减少小鼠淋巴瘤细胞 EL-4 产生的 IL-2 和 IL-5。此外，PAT 能对多种细胞（中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1、HepG2、HCT116 和 HEK293 等）造成氧化损伤[61-63]。PAT 诱导细胞中大量 ROS 产生和丙二醛（MDA）累积，造成氧化应激反应，同时损伤 DNA。过量的 ROS 诱导葡萄糖调节蛋白 78(*GRP*78)、生长停滞及 DNA 损伤可诱导蛋白 34(*GADD*34)表达量增加，GRP78 是内质网应激的标志物，其表达量增加而导致内质网应激反应的出现；GADD34 是一种促

凋亡信号分子，促进细胞凋亡[63]。另有一项研究发现，生物合成 PAT 过程中有 2 种中间体：E-ascladio 和 Z-ascladio，前者是 PAT 合成的直接前体物质，后者是它的异构体[64]，这 2 种中间体对人肝、肾、肠、免疫细胞并无毒性影响[65]。或许研究者可以通过将 PAT 转化成 E-ascladio 和 Z-ascladio 来降低 PAT 的毒性效应。PAT 的致癌作用不明确，同 DON、ZEA 一样被 IARC 列为第 3 类致癌物。

6　联合毒性

霉菌毒素一般不会单一存在，当 AFB_1、AFM_1、OTA、DON、ZEA 和 FB_1 等 2 种或多种霉菌毒素同时存在时，其毒性效应大多表现为加和作用或者协同作用，少数会表现为拮抗作用（表 2）。针对霉菌毒素联合毒性机理研究的报道不多，Ji 等[66]采用气相色谱-飞行时间质谱（GC-TOF/MS）法对 DON 和 ZEA 联合作用的小鼠巨噬细胞 Ana-1 中代谢组进行分析，发现仅当 DON 和 ZEA 联合作用时，出现了以下 4 种代谢物：棕榈酸、1-单棕榈酸甘油酯、5-磷酸核糖和 2-脱氧-*D*-半乳糖，这表明 Ana-1 细胞代谢出现了异常，加剧了对 Ana-1 细胞磷酸戊糖途径的毒性；另外代谢过程中，DON 可能抑制了 ZEA 的雌激素样作用。

表 2　霉菌毒素的联合毒性

Table 2　Toxicity of mycotoxins in combination

霉菌毒素 Mycotoxins	细胞类型 Cell type	霉菌毒素浓度 Mycotoxin concentration	毒性效应 Toxicity effect	毒性机制 Toxicity mechanism	参考文献 Reference
黄曲霉毒素 B_1+杂色曲霉素 AFB_1+ST	人肝癌细胞（HepG2）	10 μmol/L AFB_1+7.8 μmol/L ST	加和	能诱导细胞凋亡，降低线粒体膜电位	[67]
黄曲霉毒素 B_1+赭曲霉毒素 AFB_1+OTA	人肝癌细胞（HepG2）	1.2、6.0 μmol/L AFB_1+50 μmol/L OTA	加和	诱导活性氧大量产生	[68]
		1.2~150 μmol/L AFB_1+50 μmol/L OTA	拮抗	OTA 能减少 AFB_1 造成的 HepG2 细胞 DNA 链断裂	

赭曲霉毒素+黄曲霉毒 M_1 OTA+AFM_1	人结肠腺癌细胞（Caco-2）		协同		[69]
赭曲霉毒素+桔青霉素 OTA+CIT	中国仓鼠肺细胞（V79）	10、20 μmol/L OTA+10、30、50 μmol/L CIT	协同	促进微核形成	[70]
	绿猴肾细胞（Vero）	0~80 μmol/L OTA + 25 μmol/L CIT	协同	造成脂质过氧化，导致 DNA 链断裂	[71]
	猪肾细胞（PK15）	10 μmol/L OTA+50 μmol/L CTN	协同	降低还原型谷胱甘肽的含量，造成氧化应激，使克蛋白的表达增加	[72]
赭曲霉毒素+伏马毒素 OTA+FB_1	牛肾细胞（MDBK）	2 mg/mL OTA + 8 mg/mL FB_1	加和		[73]
		3 mg/mL OTA + 8 mg/mL FB_1 + 1.28 mg/mL AFB_1	协同		
展青霉素+杂色曲霉素 PAT+ST	中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO-K1）	低剂量	协同		[74]
		高剂量	加和		
脱氧雪腐镰刀菌烯醇+玉米赤霉烯酮 DON+ZEA	人结肠癌细胞（HCT116）	100 μmol/L DON+40 μmol/L ZEA	加和	细胞活力降低，周期阻滞在 G1 期，线粒体膜电位降低，通透性转换孔开放	[75]

7 小　结

细胞模型在评定霉菌毒素毒性的研究中具有诸多优点：如细胞模型易于搭建；试验条件

操作简单；与动物试验法相比，培养细胞更为经济省时等。但是，采用细胞模型开展霉菌毒素的毒性研究也具有一定的局限性，如同种毒素在不同细胞系、或同种细胞系在不同试验设计的条件下，结果可能存在差异性；同时，部分细胞模型所得到的试验结果与体内模型结果也存在矛盾。然而，值得注意的是，毒素等污染物无法进行人体试验，采用人类细胞模型进行探索性研究较为合理；同时，可结合分子生物学技术，获得能表达特定基因或蛋白质的细胞模型，形成较为稳定的评价模型。利用细胞模型，结合生物信息学及多种组学研究，可在阐明霉菌毒素毒性分子机制及作用机理研究中发挥不可替代的作用。

本文以多种细胞为模型，对 AFB_1、OTA、DON、ZEN 和 PAT 的毒性及致毒机理进行了综述。现有基于体外细胞模型的研究表明各类霉菌毒素均有不同程度的毒性，其可能的致毒机理为通过诱导氧化应激、引发细胞凋亡、损伤 DNA、阻滞细胞周期和改变线粒体膜电位等方式对多种细胞造成损伤，部分霉菌毒素还可以参与信号转导通路，影响蛋白质在通路中的正常调控作用。通过对霉菌毒素在体外细胞模型中的致毒机制的研究，可丰富霉菌毒素致毒机制的基础数据，为后续动物水平确证提供理论基础，为下一步继续筛选解毒药物及保护机制的探究提供了理论基础，为食品安全风险评估提供重要理论依据。

参考文献：

[1] HUSSEIN H S,BRASEL J M.Toxicity,metabolism,and impact of mycotoxins on humans and animals[J].Toxicology,2001,167(2):101–134.

[2] 庄振宏,张峰,李燕云,等.黄曲霉毒素致癌机理的研究进展[J].湖北农业科学,2011,50(8):1522–1525.

[3] 邹忠义,贺稚非,李洪军,等.单端孢霉烯族毒素及其脱毒微生物国外研究进展[J].食品工业科技,2012,33(8):384–389.

[4] 刘萤,王珮玥,刘雪平,等.我国现行食品与饲料中真菌毒素限量及检测标准概述[J].中国酿造,2014,33(7):10–19.

[5] BOONEN J,MALYSHEVA S V,TAEVERNIER L,et al.Human skin penetration of selected model mycotoxins[J].Toxicology,2012,301(1/2/3):21–32.

[6] MASSEY T E,SMITH G B J,TAM A S.Mechanisms of aflatoxin B_1 lung tumorigenesis[J].Experimental Lung Research,2000,26(8):673–683.

[7] YANG X,LV Y J,HUANG K L,et al.Zinc inhibits aflatoxin B_1-induced cytotoxicity and genotoxicity in human hepatocytes (HepG2 cells)[J].Food and Chemical Toxicology,2016,92:17–25.

[8] PARVEEN F,NIZAMANI Z A,GAN F,et al.Protective effect of selenomethionine on aflatoxin b1-induced oxidative stress in MDCK cells[J].Biological Trace Element Research,2014,157(3):266–274.

[9] MONSON M S,COULOMBE R A,REED K M.Aflatoxicosis:lessons from toxicity and responses to aflatoxin B_1 in poultry[J].Agriculture,2015,5(3):742–777.

[10] HAMID A S,TESFAMARIAM S G,ZHANG Y C,et al.Aflatoxin B_1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries:geographical distribution,mechanism of action and prevention[J].Oncology Letters,2013,5(4):1087–1092.

[11] LV J,YU Y Q,LI S Q,et al.Alatoxin B_1 promotes cell growth and invasion in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through H19 and E2F1[J].Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,2014,15(6):2565–2570.

[12] RAWAL S,YIP S S M,COULOMBE R A JR.Cloning,expression and functional characterization of cytochrome P450 3A37 from Turkey liver with high aflatoxin B_1 epoxidation activity[J].Chemical Research in Toxicology,2010,23(8):1322–1329.

[13] 李培武,丁小霞,白艺珍,等.农产品黄曲霉毒素风险评估研究进展[J].中国农业科学,2013,46(12):2534–2542.

[14] CHAN K T,HSIEH D P H,LUNG M L.*In vitro* aflatoxin B_1-induced p53 mutations[J].Cancer Letters,2003,199(1):1–7.

[15] BBOSA G S,KITYA D,ODDA J,et al.Aflatoxins metabolism,effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis[J].Health,2013,5(10A):14–34.

[16] GHUFRAN M S,GHOSH K,KANADE S R.Aflatoxin B_1 induced upregulation of protein arginine methyltransferase 5 in human cell lines[J].Toxicon,2016,119:117–121.

[17] AMÉZQUETA S,GONZÁLEZ-PEÑAS E,MURILLO-ARBIZU M,et al.Ochratoxin A decontamination:a review[J].Food Control,2009,20(4):326–333.

[18] 李发生,徐霞,郭乐,等.赭曲霉素 A 的毒性研究进展[J].山东畜牧兽医,2009,30(5):58–60.

[19] MALIR F,OSTRY V,PFOHL-LESZKOWICZ A,et al.Ochratoxin A:50 years of research[J].Toxins,2016,8(7):191.

[20] VRABCHEVA T,PETKOVA-BOCHAROVA T,GROSSO F,et al.Analysis of ochratoxin a in foods consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy:a 1 month follow-up study[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2004,52(8):2404–2410.

[21] GONZÁLEZ-ARIAS C A,BENITEZ-TRINIDAD A B,SORDO M,et al.Low doses of ochratoxin A induce micronucleus formation and delay DNA repair in human lymphocytes[J].Food and Chemical Toxicology,2014,74:249–254.

[22] PFOHL-LESZKOWICZ A,MANDERVILLE R A.Ochratoxin A:an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans[J].Molecular Nutrition and Food Research,2007,51(1):61–99.

[23] EL KHOURY A E,ATOUI A.Ochratoxin a:general overview and actual molecular status[J].Toxins,2010,2(4):461–493.

[24] MARIN-KUAN M,CAVIN C,DELATOUR T,et al.Ochratoxin a carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms[J].Toxicon,2008,52(2):195–202.

[25] KÖSZEGI T,POÓR M.Ochratoxin a:molecular interactions,mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level[J].Toxins,2016,8(4):111.

[26] COSTA J G,SARAIVA N,GUERREIRO P S,et al.Ochratoxin A-induced cytotoxicity,genotoxicity and reactive oxygen species in kidney cells:an integrative approach of complementary endpoints[J].Food and Chemical Toxicology,2016,87:65–76.

[27] BOUAZIZ C,SHARAF EL DEIN O,MARTEL C,et al.Molecular events involved in ochratoxin a induced mitochondrial pathway of apoptosis,modulation by Bcl-2 family members[J].Environmental Toxicology,2011,26(6):579–590.

[28] ROTTKORD U,RÖHL C,FERSE I,et al.Structure-activity relationship of ochratoxin A and synthesized derivatives:importance of amino acid and halogen moiety for cytotoxicity[J].Archives of Toxicology,2016,91(3):1461–1471.

[29] WANG Y,LIU J,CUI J F,et al.ERK and p38 MAPK signaling pathways are involved in ochratoxin A-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells[J].Toxicology Letters,2012,209(2):186–192.

[30] DARIF Y,MOUNTASSIF D,BELKEBIR A,et al.Ochratoxin a mediates MAPK activation,modulates *IL*-2 and *TNF-α* mRNA expression and induces apoptosis by mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways in human H9 T cells[J].The Journal of Toxicological Sciences,2016,41(3):403–416.

[31] WU Q H,LOHREY L,CRAMER B,et al.Impact of physicochemical parameters on the decomposition of deoxynivalenol during extrusion cooking of wheat grits[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(23):12480–12485.

[32] 尹杰,伍力,彭智兴,等.脱氧雪腐镰刀菌烯醇的毒性作用及其机理[J].动物营养学报,2012,24(1):48–54.

[33] STRASSER A,CARRA M,GHAREEB K,et al.Protective effects of antioxidants on deoxynivalenol-induced damage in murine lymphoma cells[J].Mycotoxin Research,2013,29(3):203–208.

[34] SUGIYAMA K I,KINOSHITA M,KAMATA Y,et al.Thioredoxin-1 contributes to protection against DON-induced oxidative damage in HepG2 cells[J].Mycotoxin Research,2012,28(3):163–168.

[35] BIANCO G,FONTANELLA B,SEVERINO L,et al.Nivalenol and deoxynivalenol affect rat intestinal epithelial cells:a concentration related study[J].PLoS One,2012,7(12):e52051.

[36] DIESING A K,NOSSOL C,PONSUKSILI S,et al.Gene regulation of intestinal porcine epithelial cells IPEC-J2 is dependent on the site of deoxynivalenol toxicological action[J].PLoS One,2012,7(4):e34136.

[37] DIESING A K,NOSSOL C,PANTHER P,et al.Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2[J].Toxicology Letters,2011,200(1/2):8–18.

[38] VANDENBROUCKE V,CROUBELS S,MARTEL A,et al.The mycotoxin deoxynivalenol

potentiates intestinal inflammation by *Salmonella* typhimurium in porcine ileal loops[J].PLoS One,2011,6(8):e23871.

[39] WANG Z H,WU Q H,KUČA K,et al.Deoxynivalenol:signaling pathways and human exposure risk assessment-an update[J].Archives of Toxicology,2014,88(11):1915–1928.

[40] BROEKAERT N,DEVREESE M,DEMEYERE K,et al.Comparative *in vitro* cytotoxicity of modified deoxynivalenol on porcine intestinal epithelial cells[J].Food and Chemical Toxicology,2016,95:103–109.

[41] LI D T,YE Y Q,DENG L,et al.Gene expression profiling analysis of deoxynivalenol-induced inhibition of mouse thymic epithelial cell proliferation[J].Environmental Toxicology and Pharmacology,2013,36(2):557–566.

[42] 李季伦,朱彤霞,张篪,等.玉米赤霉烯酮的研究[J].北京农业大学学报,1980,15(1):13–28.

[43] 邓友田,袁慧.玉米赤霉烯酮毒性机理研究进展[J].动物医学进展,2007,28(2):89–92.

[44] LI Y Z,ZHANG B Y,HUANG K L,et al.Mitochondrial proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying reproductive toxicity of zearalenone in MLTC-1 cells[J].Toxicology,2014,324:55–67.

[45] ZHU L,YUAN H,GUO C Z,et al.Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3-and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway[J].Journal of Cellular Physiology,2012,227(5):1814–1820.

[46] GAZZAH A C,CAMOIN L,ABID S,et al.Identification of proteins related to early changes observed in Human hepatocellular carcinoma cells after treatment with the mycotoxin Zearalenone[J].Experimental and Toxicologic Pathology,2013,65(6):809–816.

[47] KANG C,LEE H,YOO Y S,et al.Evaluation of oxidative DNA damage using an alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) comet assay,and the protective effects of N-acetylcysteine amide on zearalenone-induced cytotoxicity in chang liver cells[J].Toxicological Research,2013,29(1):43–52.

[48] TATAY E,FONT G,RUIZ M J.Cytotoxic effects of zearalenone and its metabolites and antioxidant cell defense in CHO-K1 cells[J].Food and Chemical Toxicology,2016,96:43–49.

[49] VENKATARAMANA M,NAYAKA S C,ANAND T,et al.Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells:the role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine[J].Food and Chemical Toxicology,2014,65:335–342.

[50] XU M L,HU J,GUO B P,et al.Exploration of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in zearalenone-treated rat sertoli cells[J].Environmental Toxicology,2016,31(12):1731–1739.

[51] YANG D Q,JIANG T T,LIN P F,et al.Apoptosis inducing factor gene depletion inhibits zearalenone-induced cell death in a goat leydig cell line[J].Reproductive Toxicology,2017,67:129–139.

[52] YU J Y,ZHENG Z H,SON Y O,et al.Mycotoxin zearalenone induces AIF-and ROS-mediated cell death through p53-and MAPK-dependent signaling pathways in RAW264.7 macrophages[J].Toxicology in Vitro,2011,25(8):1654–1663.

[53] SALEM I B,BOUSSABBEH M,DA SILVA J P,et al.SIRT1 protects cardiac cells against apoptosis induced by zearalenone or its metabolites α-and β-zearalenol through an autophagy-dependent pathway[J].Toxicology and Applied Pharmacology,2017,314:82–90.

[54] 周玉春,杨美华,许军.展青霉素的研究进展[J].贵州农业科学,2010,38(2):112–116.

[55] MOHAN H M,COLLINS D,MAHER S,et al.The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability *in vitro*[J].Food and Chemical Toxicology,2012,50(11):4097–4102.

[56] DONMES-ALTUNTAS H,GOKALP-YILDIZ P,BITGEN N,et al.Evaluation of genotoxicity,cytotoxicity and cytostasis in human lymphocytes exposed to patulin by using the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) assay[J].Mycotoxin Research,2013,29(2):63–70.

[57] PUEL O,GALTIER P,OAWALD I P.Biosynthesis and toxicological effects of patulin[J].Toxins,2010,2(4):613–631.

[58] WICHMANN G,HERBARTH O,LEHMANN I.The mycotoxins citrinin,gliotoxin,and patulin affect interferon-γ rather than interleukin-4 production in human blood cells[J].Environmental Toxicology,2002,17(3):211–218.

[59] LUFT P,OOSTINGH G J,GRUIJTHUIJSEN Y,et al.Patulin influences the expression of

Th1/Th2 cytokines by activated peripheral blood mononuclear cells and T cells through depletion of intracellular glutathione[J].Environmental Toxicology,2008,23(1):84–95.

[60] MARIN M L,MURTHA J,DONG W M,et al.Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells[J].Journal of Toxicology and Environmental Health,1996,48(4):379–396.

[61] AYED-BOUSSEMA I,ABASSI H,BOUAZIZ C,et al.Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells[J].Environmental Toxicology,2013,28(6):299–306.

[62] FERRER E,JUAN-GARCÍA A,FONT G,et al.Reactive oxygen species induced by beauvericin,patulin and zearalenone in CHO-K1 cells[J].Toxicology in Vitro,2009,23(8):1504–1509.

[63] BOUSSABBEH M,PROLA A,BEN SALEM I,et al.Crocin and quercetin prevent PAT-induced apoptosis in mammalian cells:involvement of ROS-mediated ER stress pathway[J].Environmental Toxicology,2016,31(12):1851–1858.

[64] 郭彩霞,张生万,李美萍.苹果及其制品中展青霉素生物防治研究进展[J].食品科学,2015,36(7):283–288.

[65] TANNOUS J,SNINI S P,EL KHOURY R,et al.Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway,E-and Z-ascladiol,are not toxic to human cells[J].Archives of Toxicology,2016,91(6):2455–2467.

[66] JI J,ZHU P,PI F W,et al.GC-TOF/MS-based metabolomic strategy for combined toxicity effects of deoxynivalenol and zearalenone on murine macrophage ANA-1 cells[J].Toxicon,2016,120:175–184.

[67] LIU Y,DU M,ZHANG G Y.Proapoptotic activity of aflatoxin B_1 and sterigmatocystin in HepG2 cells[J].Toxicology Reports,2014,1:1076–1086.

[68] CORCUERA L A,ARIBILLAGA L,VETTORAZZI A,et al.Ochratoxin A reduces aflatoxin B_1 induced DNA damage detected by the comet assay in HepG2 cells[J].Food and Chemical Toxicology,2011,49(11):2883–2889.

[69] GAO Y N,WANG J Q,LI S L,et al.Aflatoxin M_1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins[J].Food and Chemical Toxicology,2016,96:79–89.

[70] FÖLLMANN W,BEHM C,DEGEN G H.Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A *in vitro*[J].Archives of Toxicology,2014,88(5):1097–1107.

[71] BOUSLIMI A,OUANNES Z,EL GOLLI E,et al.Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin A and citrinin:individual and combined effects[J].Toxicology Mechanisms and Methods,2008,18(4):341–349.

[72] KLARIĆ M Š,MEDIĆ N,HULINA A,et al.Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments[J].Food and Chemical Toxicology,2014,71:97–105.

[73] CLARKE R,CONNOLLY L,FRIZZELL C,et al.Cytotoxic assessment of the regulated,co-existing mycotoxins aflatoxin B_1,fumonisin B_1 and ochratoxin,in single,binary and tertiary mixtures[J].Toxicon,2014,90:70–81.

[74] ZOUAOUI N,MALLEBRERA B,BERRADA H,et al.Cytotoxic effects induced by patulin,sterigmatocystin and beauvericin on CHO-K1 cells[J].Food and Chemical Toxicology,2016,89:92–103.

[75] BENSASSI F,GALLERNE C,EL DEIN O S,et al.*In vitro* investigation of toxicological interactions between the fusariotoxins deoxynivalenol and zearalenone[J].Toxicon,2014,84:1–6.

Evaluation of Mycotoxin Toxicity Based on Cell Model *in vitro*

QIU Siqi[1,2] XU Zhenzhen[1*] SHEN Hong[2] YANG Shuming[1] CHEN Ailiang[1] ZHAO Yan[1]

（1. *Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-Products*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*; *Key Laboratory of Agro-food Safety and Quality*, *Ministry of Agriculture*, *Beijing* 100081, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology* ,*Beijing University of Agriculture*, *Beijing* 102206, *China*）

Abstract: Mycotoxins are secondary metabolites produced by various fungi, which are widely found in food and feed. The contamination of mycotoxins on food and feed will result a large risk in livestock production and quality and safety of animal products. It is necessary to study the toxic mechanism of mycotoxins in order to evaluating the risk of food and feed safety. As a commonly used method *in vitro*, cell model is widely used in toxicology research. This paper reviews general property, toxicity and toxic mechanism of aflatoxin B_1, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone and patulin based on cell model *in vitro*.

Key words: mycotoxin; toxicity; cell model

*Corresponding author, assitant professor, E-mail: xuzhenzhen@caas.cn （责任编辑　武海龙）